

氏名（本籍）	喜早 慧士（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第280号
学位授与の日付	平成30年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	脳梗塞後の神経幹・前駆細胞の病態生理学的変化に及ぼす GSK-3 β 情報伝達系の関与に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 高木 教夫 教授 馬場 広子 教授 立川 英一

論文内容の要旨

脳梗塞は、患者の約8割で後遺症が認められ、最重度の要介護認定を受ける疾患の第1位である。脳梗塞慢性期では、再発予防を目的とする抗血小板薬と抗凝固薬に加え、脳梗塞発症の危険因子である生活習慣病を是正する薬物が使用される。しかし、脳梗塞後の組織損傷や症状の改善を望めるものがほとんど存在しないため新たな脳梗塞慢性期の治療薬や治療法の開発は重要な課題である。

近年、幹細胞研究の飛躍的な発展により難治性疾患に対する新たな治療アプローチの1つとして幹細胞に焦点を当てた再生医療が注目を集めている。この再生医療を利用した脳梗塞に対する治療法は外因性の幹細胞を移植して神経再生を促す方法と内因性の神経新生を賦活化し、脳組織を再生あるいは脳機能を改善する方法の2種類に大別される。脳梗塞に対する幹細胞移植は基礎研究レベルで数多く行われており、これらの成果の臨床応用が期待されている。しかし、安全性の確保などの問題から今後も多くの基礎研究を積み重ねる必要があると考えられている。一方で神経新生は、脳梗塞後に増強され内因性の再生機構の1つであると考えられている。新生した神経細胞は障害領域に遊走され、その一部が障害を受けた神経回路に統合されると考えられる。しかし、脳梗塞後に惹起される神経新生は一過性であり、その新生神経細胞数は機能回復するために十分数達していないことや障害領域で生じる炎症や活性酸素種などが原因でその大半が神経回路に統合されることなく死滅することなど、その病態生理学的意義と治療への応用には解決すべき多くの課題が残っている。したがって、脳梗塞後神経新生の病態生理学的変化の理解は、患者・医療ニーズを満たす脳梗塞の新たな治療戦略につ

ながると考えられる。

神経新生は多くの細胞内情報伝達機構によって制御されている。GSK-3 β は中枢神経系に豊富に発現し、様々な基質をリン酸化することで多くの細胞機能を制御している。GSK-3 β は種々の中枢神経疾患と密接に関わることに加え、ある種の抗精神病薬は GSK-3 β を阻害し、神経新生増強効果を有することが報告されている。すなわち、GSK-3 β は脳梗塞後神経新生においても重要な病態生理学的意義をもつと考えられる。

そこで本研究の第 1 章では、ヒト多発性梗塞を模倣したラットマイクロスフェア脳塞栓 (microsphere embolism : ME) モデルを用いて脳梗塞後に誘発される神経新生と GSK-3 β 情報伝達系の病態生理学的関連を検討した。第 2 章では、低酸素条件下で培養した神経幹細胞を用い、第 1 章で明らかになった分子メカニズムが神経幹細胞内で誘発され、それらの増殖および分化過程に関与しているか否かを検討した。

第 1 章 脳梗塞後神経新生における GSK-3 β 情報伝達系の変化

海馬歯状回の神経新生は認知機能や気分障害と密接に関与している。また、脳梗塞患者の半数以上で認知機能障害を呈することからも海馬における脳梗塞後神経新生の機序を明らかにすることはきわめて重要であると言える。そこで本章では、脳塞栓後の神経新生とそれに及ぼす GSK-3 β 情報伝達系の関与を検討した。ME 後 7 日目の海馬歯状回では、増殖性細胞数が増加し、かつそれらの細胞の一部は神経前駆細胞のマーカーを共発現し、神経細胞へと分化していた。また、ME 後 7 日目の海馬歯状回では神経分化に重要な役割を果たす NeuroD の陽性細胞数が増加した (Fig. 1)。

以上の結果より、ME 後 7 日目の海馬歯状回では、神経新生が

惹起されており、そのメカニズムの一端に NeuroD の発現が関与している可能性が示唆された。次に、NeuroD 発現に寄与する情報伝達系が脳梗塞後神経新生に関与するか否かを解明するために、その情報伝達系を構成するタンパク質の変化を検討した。その結果、GSK-3 β とその上流に位置する Akt のリン酸化レベルが ME 後 7 日目で増加していた (Fig. 2)。

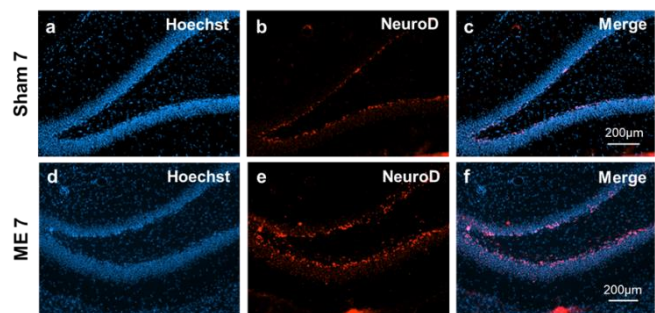


Fig.1 Change of the number of NeuroD-positive cells after surgery. Cells in the dentate gyrus were stained by Hoechst33342 (Hoechst). NeuroD-positive cells presented in the SGZ of sham- (b) and ME-operated (e) dentate gyrus of ME rats. Images of double staining with Hoechst33342 (blue) and NeuroD (red) represented. Scale bars show 200 μ m.

次に GSK-3 β の下流シグナル分子である β -catenin の細胞質でのリン酸化レベルの検討を行った。その結果、ME 後 7 日目の細胞質の β -catenin の

リン酸化レベルは減少していた。 β -Catenin は通常、細胞質でリン酸化された後、プロテアソームによって分解される。しかし、何らかの理由で β -catenin がリン酸化を免れると細胞質内で安定化し、核内へ移行することで種々の遺伝子の転写を促進することが知られている。したがって、 β -catenin の核内移行によって細胞の増殖や分化を調節する遺伝子の転写が促進されていることが推察された。さらに、GSK-3 β 情報伝達系が脳梗塞後神経新生に寄与することを明確にするために、GSK-3 β の上流に位置する PI3-K/Akt 経路の阻害薬である wortmannin の脳梗塞後神経新生に及ぼす影響を検討した。Wortmannin 投与により ME 後 7 日目に増強された Akt および GSK-3 β のリン酸化が抑制された。また、その下流の β -catenin のリン酸化レベルの低下も wortmannin 投与により抑制される傾向であった。さらに、wortmannin 投与による NeuroD 陽性細胞数の影響を蛍光免疫染色法で検討したところ、その細胞数は wortmannin 非投与群のそれと比較し減少していた (Fig. 3)。これらの結果から、ME 後 7 日目に観察された GSK-3 β / β -catenin 情報伝達系の活性化の一部は、PI3-K/Akt 経路依存的であり、神経新生関連遺伝子である NeuroD の発現を増強する可能性が示された。一方、PI3-K/Akt 経路の上流に位置し、神経新生に関与すると考えられている IGF-1 および BDNF は ME 後 7 日目に著しく減少していた。さらに、GDNF や PDGF-BB などの他の成長因子の発現量は変化しなかったため、PI3-K/Akt 経路の上流因子の同定は今後の検討課題である。

以上の結果より、脳梗塞後神経新生のメカニズムの一端に PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系を介した NeuroD の発現増強が関与していることを、*in vivo* 病態モデルを用い明らかにした。

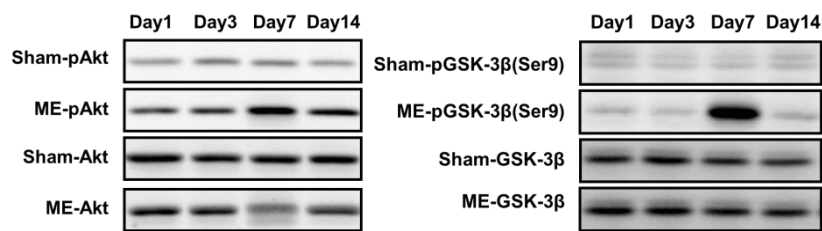


Fig. 2 Changes in the levels of phosphorylation of Akt and GSK-3 β after surgery. Bands corresponding to phosphorylated and total Akt and GSK-3 β of ipsilateral hemisphere in Sham- (Sham) and ME-operated rats (ME) on days 1, 3, 7, 14 after surgery were detected by western immunoblot.

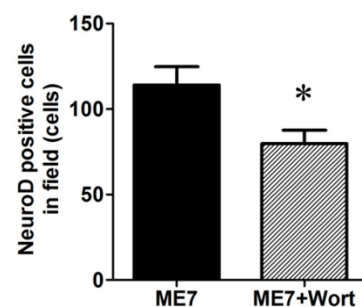


Fig. 3 Effect of wortmannin on the number of NeuroD-positive cells. Number of NeuroD-positive cells in the ipsilateral SGZ on Day 7 after ME without (ME7) or with wortmannin (ME7 + Wort) was counted. Values for NeuroD-positive cells are represented as the mean \pm SEM. *Significant difference from the ME-operated group ($p < 0.05$).

第 2 章 低酸素条件下の神経幹細胞における GSK-3 β 情報伝達系の変化

第 1 章では, ME 後に誘発される神経新生過程において PI3-K/Akt 経路依存的に GSK-3 β 情報伝達系が関与することを示した. しかし, 脳は神経細胞, グリア細胞, 血管を構成する細胞など多種の細胞で構築されているため, この情報伝達経路の変化が実際に神経幹細胞内で生じているか不明である. そこで本章では, *in vivo* の病態を模倣するために低酸素条件下で培養した神経幹細胞を用い, その増殖および分化過程に GSK-3 β 情報伝達系が関与する

か否かを検討した. はじめに, 低酸素暴露後 48 時間目の神経幹細胞の増殖能を XTT 染色法で検討した. その結果, 通常酸素群と比べて低酸素群で細胞増殖能が約 1.5 倍増強されていた. また, 低酸素暴露後 24 および 48 時間目の Akt および GSK-3 β のリン酸化レベルは通常酸素群に比べて増大した. さらに, その下流に存在する活性型 β -catenin

および核内へ移行した β -catenin レベルが低酸素暴露により増加していた. 次に, この低酸素による細胞増殖能の増強に Akt/GSK-3 β 情報伝達経路の関与を検討するために, PI3-K の選択的阻害薬である LY294002 を用いて検討した. LY294002 の処置により通常酸素および低酸素条件下の神経幹細胞は濃度依存的に細胞増殖能の低下を示した (Fig. 4). さらに, 低酸素によって増強された Akt および GSK-3 β のリン酸化レベルは LY294002 処置により抑制された (Fig. 5). また, 活性型 β -catenin の発現量の増加も抑制され, 核内に存在する β -catenin レベルも減少していた. 以上の結果から, 低酸素によって惹起される細胞増殖能の増強には PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系が関与していることが示された. 最後に, 低酸素条件

下での神経幹細胞の多分化能と Akt/GSK-3 β 情報伝達系との関係を検討した結果, 低酸素暴露によりアストロサイトへの分化は抑制され, 神経細胞への分化が増強された. しかし, 低酸素による神経分化能の増強は LY294002 処置により変化しなかった. この結果は, 低酸素による神経分化能の増強に

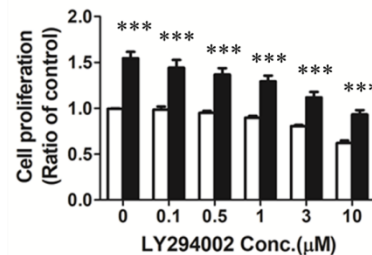


Fig. 4 Effects of LY294002 on the proliferation of neural stem/progenitor cells after 48 hours of normoxic and hypoxic exposure. After treatment with various concentrations (0.1, 0.5, 1, 3, 10 μ M) of LY294002 under normoxic (white bars) or hypoxic condition (black bars) for 48 hr, proliferation of neural stem/progenitor cells was determined by XTT assay. Values are represented as means \pm SEM. ***Significant difference from the normoxic group ($p < 0.001$).

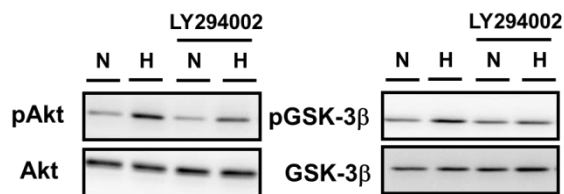


Fig. 5 Effects of LY294002 on the phosphorylation of Akt and GSK-3 β in neural stem/progenitor cells 24 hr after hypoxic exposure. Bands corresponding to phosphorylated and total Akt and GSK-3 β after normoxic (N; Normoxia) and hypoxic (H; Hypoxia) exposure with or without LY294002 for 24 hour were detected by western immunoblot.

PI3-K/Akt/GSK-3 β 経路は関与する可能性が低いことを示している。第 1 章の結果をふまえると、PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系の神経分化過程への関与は中枢神経系を構成する神経幹細胞以外の細胞種により惹起される可能性が示された。

以上本章では、低酸素暴露による増殖過程には神経幹・前駆細胞内の PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系が関与している可能性を示した。

以上、本研究では脳梗塞後に増強される神経新生に PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系を介した NeuroD の発現が関与することを *in vivo* 病態モデルを用い明らかにした。さらに、単離神経幹細胞を用いた *in vitro* 低酸素モデルにおいて、PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系が神経幹細胞内で活性化し、神経細胞への分化過程ではなく、増殖過程に寄与していることを明らかにした。これらの研究成果は、脳梗塞後神経新生の機序の一端を明らかにし、新たな脳梗塞治療を開発する上で、有用な知見を与えるものと考えられる。

【研究成果の掲載誌】

1) *Molecular Neurobiology*, 54, 7917-7927 (2017)

論文審査の結果の要旨

脳梗塞は、患者の約 8 割で後遺症が認められ、かつ最重度の要介護認定を受ける率が最も高い疾患である。脳梗塞慢性期では、再発予防を目的とする抗血小板薬と抗凝固薬に加え、生活習慣病を是正する薬物が使用されるものの、脳梗塞による組織損傷や機能不全の改善を望めるものはほとんど存在しない。そのため、新たな脳梗塞慢性期の治療薬や治療法の開発は重要な課題となっている。近年、難治性疾患に対する新たな治療アプローチとして幹細胞に焦点を当てた方法が注目を集めている。しかし、神経新生は脳梗塞後に増強されるものの一過性であり、その新生神経細胞量は機能回復するために十分量達していないことや炎症などが原因でその大半が神経回路に統合されることなく死滅することなど、その病態生理学的意義と治療への応用には解決すべき多くの課題が残っている。GSK-3 β は種々の中枢神経疾患と密接に関わることに加え、ある種の抗精神病薬は GSK-3 β を阻害し、神経新生増強効果を有することが報告されている。本研究は、ヒト多発性梗塞を模倣したラットマイクロスフェア脳塞栓(microsphere embolism : ME)モデルを用いて脳梗塞後に誘発される海馬歯状回での神経新生と GSK-3 β 情報伝達系の病態生理学的関連を検討し、さらに低酸素条件下で培養した神経幹細胞を用い、神経幹細胞内で誘発される神経新生の分子メカニズムの解明を試みたものである。

第 1 章では、ヒト多発性梗塞を模倣するラットマイクロスフェア脳塞栓(ME)モデルを使用して、脳塞栓後の神経新生とそれに及ぼす GSK-3 β 情報伝達系の関与を検討している。その結果、ME 後 7 日目の海馬歯状回では、増殖性細胞数が増加し、その一部が神経細胞へ分化すること、神経分化に重要な役割を果たす NeuroD 陽性細胞数が増加することを示した。この NeuroD 陽性細胞数の増加は、PI3-K 阻害薬を用いた実験により PI3-K/Akt 経路依存的な GSK-3 β / β -catenin 経路の活性化に起因することを明らかにした。一方、PI3-K/Akt 経路の上流に位置し、神経新生に関与すると考えられた IGF-I および BDNF は ME 後 7 日目に著しく減少することを示した。さらに、GDNF や PDGF-BB などの他の成長因子についてもその発現量は変化しないことを示した。以上の結果より、PI3-K/Akt 経路を活性化する上流因子の同定は今後の検討課題だが、脳梗塞後神経新生のメカニズムの一端に PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系を介した NeuroD の発現増強が関与していることを明らかにした。

第 2 章では、低酸素暴露した神経幹細胞を用いて、第 1 章で示された ME 後の脳梗塞後神経新生のメカニズムを検討している。単離した胎生 14 日齢ラット胎児脳由来細胞の性質を解析した結果、本研究に使用した細胞は自己複製能および多分化能を有する神経幹/前駆細胞であることが示された。次に神経幹/前駆細胞の細胞増殖能および神経分化能に及ぼす低酸素暴露の影響と GSK-3 β 情報伝達系の関与について検討した結果、低酸素暴露により神経幹細胞の細胞増殖能が増強することを示した。この増殖能の増強は、PI3-K 阻害薬を用いた実験により PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系の活性化が一因であることを明らかにした。一方、低酸素暴露によって神経分化能は増強されたものの、そのメカニズムに PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系の活性化は寄与していないことを明らかにした。第 1 章の結果をふまえると、PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系の神経分化過程への関与は中枢神経系を構成する他の細胞種により惹起される可能性を示した。

以上、本研究では脳梗塞後に増強される神経新生に PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系を介した NeuroD 発現が関与することを *in vivo* 病態モデルを用い明らかにした。さらに、単離神経幹細胞を用いた *in vitro* 低酸素モデルにおいて、PI3-K/Akt/GSK-3 β 情報伝達系が神経幹細胞内で活性化し、神経細胞への分化過程ではなく、増殖過程に寄与していることを明らかにした。これらの研究成果は、脳梗塞後神経新生の機序の一端を明らかにし、新たな脳梗塞治療を開発する上で、有用な知見を与えるものといえる。したがって、本申請論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものと判断する。